

Вольтамперометрическое определение тиол-дисульфидного коэффициента по электрокаталитическому отклику электрода, модифицированного гексахлороплатинатом кобальта

**Л.Г. Шайдарова*, А.В. Гедмина, Э.Р. Жалдак,
И.А. Челнокова, Г.К. Будников**

*Казанский федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова,
Российская Федерация, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18*

**Адрес для переписки: Шайдарова Лариса Геннадиевна, E-Mail: LarisaShaidarova@mail.ru*

Поступила в редакцию 25 ноября 2014 г., после исправления – 29 января 2015 г.

Среди серосодержащих соединений наибольший интерес в биомедицине представляют системы с редокс-парой тиол/дисульфид. Это связано с тем, что важнейшей частью антиоксидантной системы, которая превращает свободные радикалы в малоактивные продукты и прерывает цепные реакции, протекающие в организме, является тиол-дисульфидное звено, количественной характеристикой которого является тиол/дисульфидный коэффициент ($-SH/-SS-$). Определение этого коэффициента в биологических жидкостях (в плазме крови) используют для диагностики и изучения динамики терапевтического лечения заболеваний. Разработан способ вольтамперометрического определения серосодержащих соединений на электроде, модифицированном пленкой из гексахлороплатината кобальта, который использовали для определения тиол/дисульфидного коэффициента (ТДК). Для расчета ТДК определяют суммарное содержание тиолов и дисульфидов в крови, используя обычно системы цистин/цистеин и глутатион окисленный/глутатион восстановленный. Установлено, что каталитический эффект наблюдается на электроде с пленкой гексахлороплатината кобальта при окислении всех выше перечисленных серосодержащих соединений. Каталитический эффект выражается в уменьшении потенциала и многократном увеличении тока окисления этих соединений на предложенном пленочном электроде. Линейная зависимость величины каталитического тока от концентрации аналитов наблюдается в интервале от 0.5 мкМ до 50.0 мМ. Предложенный способ использован для определения ТДК в крови. Эти значения, равные 2.54 и 2.61, соответствуют стандартному показателю для здорового человека.

Ключевые слова: химически модифицированный электрод, гексахлороплатинат кобальта, электрокатализ, тиол-дисульфидный коэффициент.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2015, vol. 19, no. 1, pp. 85-93.

DOI: 10.15826/analitika.2015.19.1.002

Voltammetric determination of thiol-disulfide coefficient using electrocatalytic response of cobalt hexachloroplatinate modified electrode

**L.G. Shaidarova*, A.V. Gedmina, E.R. Zhaldak,
I.A. Chelnokova, H.C. Budnikov**

*Kazan Federal University, A.M. Butlerov Chemical Institute, ul. Kremlevskaia 18, Kazan, 420008,
Russian Federation*

**Corresponding author: Larisa G. Shaidarova, E-mail: LarisaShaidarova@mail.ru*

Submitted 25 November 2014, received in revised form – 29 January 2015.

The greatest interest in biomedicine among sulfur-containing compounds are the systems with redox couple thiol / disulfide. This is due to the fact that the most important part of the antioxidant system that converts free radicals into the low-activity products and interrupts the chain reactions in the body is a thiol-disulfide link with thiol / disulfide ratio ($-SH/-SS-$ – coefficient) as its quantitative characteristic. Determination of this coefficient in the biological fluids (blood plasma) is used for the diagnosis and the study of the therapeutic

treatment dynamics. The methods for the sulfur compounds voltammetric determination at the electrode modified by a film of cobalt hexachloroplatinate are developed and used for thiol/disulfide coefficient (TDC) determination. For the calculation of the TDC value the total substance of thiols and disulfides in the blood is defined using cystine / cysteine and glutathione oxidized / glutathione systems. A catalytic effect on the electrode modified with the cobalt hexachloroplatinate film is observed during the oxidation of all above mentioned sulfur-containing compounds. This effect results in decreasing potential and multiple increasing of sulfur containing compounds oxidation current. The linear dependence of the catalytic current from analyte concentration is observed in the range from 0.5 μM to 5.0 μM . The proposed method was used for determination of the TDC in the blood.

Key words: chemically modified electrode, cobalt hexachloroplatinate, electrocatalysis, thiol-disulphide coefficient

Введение

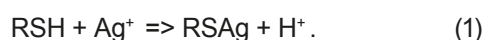
Среди серосодержащих органических соединений в биомедицине наибольший интерес представляют редокс-системы типа тиол/дисульфид, поскольку они являются важнейшей частью антиоксидантной защиты организма. В этой системе тиол-дисульфидное звено превращает свободные радикалы в малоактивные продукты, что прерывает цепные реакции. Количественной характеристикой этого процесса является тиол/дисульфидный коэффициент ($-\text{SH}/-\text{SS}-$). Однако, при многократном избытке свободных радикалов происходит неконтролируемое свободнорадикальное окисление тиолов и тиольных функциональных групп биомолекул (белков, нуклеиновых кислот и др.), что приводит к нарушению состояния функционального звена тиол-дисульфидной окислительно-восстановительной системы и изменение величины коэффициента $-\text{SH}/-\text{SS}-$ [1, 2]. Такое состояние называется окислительный стресс.

Многочисленные научные публикации подтверждают, что окислительный стресс ведет к развитию ряда опасных заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца, атеросклероз, катаракта, онкологические заболевания, вирус иммунодефицита человека и многие др. Установлено также, что окислительный стресс воздействует и на геном человека, вызывая целый ряд наследственных аутосомно-рецессивных заболеваний [1-4]. Кроме того, в основе изучения механизма старения лежит теория окислительного стресса. Поэтому чрезвычайно важно диагностировать начало развития окислительного стресса, пока он не привел к серьезным изменениям в организме. [2, 5, 6].

Для расчета показателя тиол/дисульфидного коэффициента (ТДК) определяют суммарное содержание тиолов и дисульфидов в биологических жидкостях (например, в плазме крови). При этом обычно используют системы цистин/цистеин и глутатион окисленный/глутатион восстановленный [5-7].

Из сказанного следует, что разработка универсальных методов определения содержания тиол-дисульфидных соединений является актуальной. Наиболее доступным в лабораторной клинической практике способом определения ($-\text{SH}$) и ($-\text{SS}-$) групп

является амперометрическое титрование нитратом серебра [8]. Принцип метода состоит в титровании раствора тиолового соединения азотнокислым серебром, в ходе которого ионы серебра связываются SH -группами с образованием устойчивого меркаптида согласно следующему уравнению:



Этот метод используют в клинической практике медицинских организаций для оценки состояния антиоксидантной системы и эффективности использования медикаментозных средств и методов лечения.

Среди прямых методов определения тиолов и дисульфидов применяют хроматографию [10, 11], капиллярный электрофорез [12, 13], оптические [14] и электрохимические методы [15]. В случае оптических методов анализа дисульфиды восстанавливают с помощью соответствующих реагентов до тиолов с последующей дериватизацией в соединения с хромофорными и флюорофорными группировками [16]. Поэтому при использовании оптических методов необходимо проводить предварительную пробоподготовку, что приводит к увеличению длительности проведения самого анализа. К недостаткам этих методов следует отнести не только длительность пробоподготовки, но и недостаточную чувствительность и высокую стоимость оборудования.

Электрохимические методы анализа отличаются дешевизной аппаратуры, простотой эксперимента, экспрессностью и высокой чувствительностью. Прямое окисление тиолов до соответствующих дисульфидов, а дисульфидов до сульфоновых кислот на немодифицированном углеродном электроде является самым простым способом их определения. Однако окисление этих веществ проходит с большим перенапряжением, а сам способ определения характеризуется низкой чувствительностью и селективностью. Использование химически модифицированных электродов (ХМЭ), функционирующих на принципах электрокатализа, позволяет устранить эти недостатки [17, 18].

В настоящей работе изучена возможность вольтамперометрического определения ТДК на электроде из стеклоглерода (СУ), модифицированном пленкой гексахлороплатината кобальта (CoPtCl_6).

Условия эксперимента

Циклические вольтамперограммы регистрировали с помощью вольтамперографа ЭкоТест-ВА (ООО «ЭКОНИК-ЭКСПЕРТ», Россия), используя трехэлектродную ячейку. В качестве индикаторного электрода применяли электрод из СУ с рабочей поверхностью 0.1 см^2 , а также СУ с электроосажденными пленками гексахлороплатината кобальта (II) ($\text{CoPtCl}_6\text{-СУ}$). Электродом сравнения служил хлоридсеребряный электрод, вспомогательным – платиновая проволока. Циклические вольтамперограммы регистрировали при скорости наложения потенциала (v), равной 20 мВ/с . При изучении природы предельного тока и для расчета кинетических параметров окисления цистеина, цистина, глутатиона восстановленного и глутатиона окисленного рассматривали зависимости величины тока и потенциала окисления от скорости наложения потенциала, которую варьировали в диапазоне от 10 до 100 мВ/с . Перед модификацией электрод из СУ шлифовали на фильтровальной бумаге и кальке, промывали бидистиллированной водой и активировали многократным сканированием потенциала в 0.5 М растворе H_2SO_4 .

Осаждение пленки CoPtCl_6 осуществляли из водного раствора, полученного растворением исходных соединений CoCl_2 и H_2PtCl_6 (марки «ч» фирмы Aldrich) в 0.01 М растворе H_2SO_4 . Электроосаждение неорганической полимерной пленки проводили потенциодинамически, циклически изменяя потенциал со скоростью наложения потенциала 100 мВ/с . Электрод с иммобилизованной пленкой CoPtCl_6 помещали в 0.1 М растворе NaOH и циклировали потенциал для формирования на поверхности электрода оксоформ кобальта (III, IV) [19].

В качестве субстратов использовали цистеин, цистин, глутатион восстановленный и глутатион окисленный (марки «ч» фирмы Aldrich). Стандартные растворы цистеина, цистина, глутатиона восстановленного и глутатиона окисленного с концентрацией $5 \times 10^{-3} \text{ М}$ готовили растворением его точной навески в водном растворе фонового электролита. Растворы с меньшими концентрациями получали последовательным разбавлением исходного стандартного раствора. В качестве фонового электролита использовали 0.1 М раствор NaOH . Контроль величины pH проводили на pH-метре типа pH-150.

Электрохимическое поведение электроосажденной на стеклоглеродном электроде пленки гексахлороплатината кобальта

Предварительно было изучено электрохимическое осаждение на поверхности СУ неорганической пленки CoPtCl_6 , проводимое методом потенциодинамического электролиза. На рис. 1, а показаны циклические вольтамперограммы (ЦВА), регистрируемые на электроде из СУ в растворе 0.01 М H_2SO_4 ,

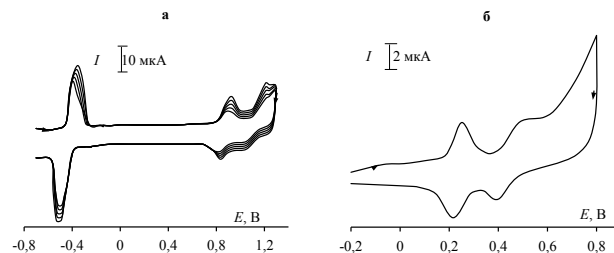
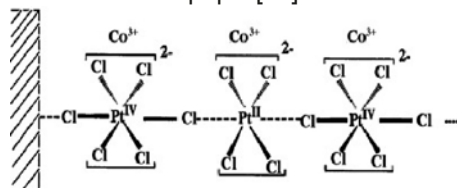
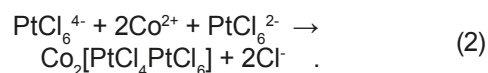


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы, полученные при электроосаждении неорганической пленки из 0.01 М раствора H_2SO_4 , содержащего $1.0 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ CoCl_2 и $0.8 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ H_2PtCl_6 , в области потенциалов от $+1.30 \text{ В}$ до -0.70 В со скоростью наложения потенциала 100 мВ/с в течение пяти циклов (а), циклическая вольтамперограмма, полученная на ХМЭ с пленкой CoPtCl_6 на фоне 0.1 М раствора NaOH (б)

содержащей $1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ CoCl_2 и $1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ H_2PtCl_6 , в области потенциалов от -0.70 В до $+1.30 \text{ В}$ со скоростью наложения потенциала, равной 100 мВ/с . Как видно из рис. 1, а, с каждым последующим циклом пики на анодной ветви ЦВА растут, а их потенциалы смещаются в анодную область, что связано с осаждением 'большого количества модификатора и ростом толщины одномерно структурированной пленки, формирующейся на поверхности СУ. Эти одномерные цепи представляют собой смешанно-валентный платиновый комплекс, состоящий из чередующихся планарных $d^8 \text{ Pt}^{\text{II}}$ и октаэдрических $d^6 \text{ Pt}^{\text{IV}}$ комплексных форм [20]:

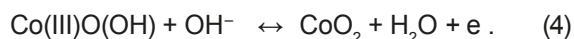
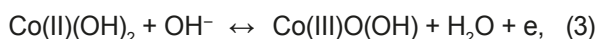


Таким образом, полученную смешанно-валентную полимерную пленку можно представить эмпирической формулой CoPtCl_6 [21-23]. Вольтамперные характеристики полученной пленки зависят от интервала циклирования потенциала при потенциодинамическом электролизе. При сканировании потенциала только от 0.7 В до 0.0 В или от 0.0 В до -0.8 В формирование пленки CoPtCl_6 не происходит, возможно из-за необходимости для формирования пленки присутствия редокс-пар $\text{Pt}^{4+}/\text{Pt}^{2+}$ и $\text{Ru}^{3+}/\text{Ru}^{2+}$. Связи с этим, можно предположить следующую схему образования такой пленки:



Электрохимическая активность полученной иммобилизованной пленки проявляется только в щелочной среде. На анодной ветви ЦВА, полученной на ХМЭ с пленкой CoPtCl_6 на фоне 0.1 М NaOH (рис. 1, б), регистрируются два обратимых пика при $+0.25 \text{ В}$ и $+0.55 \text{ В}$, связанные с образованием на по-

верхности СУ нерастворимых оксо-гидроксида кобальта (III) и оксида кобальта (IV) [24-25]:



Полученные пленки отличаются высокой химической и электрохимической устойчивостью, о чем свидетельствует хорошая воспроизводимость вольтамперограмм, полученных при циклировании потенциала на фоне 0.1 М NaOH в течение недели.

Электрокаталитическое окисление цистеина и цистина, глутатиона восстановленного и глутатиона окисленного на электроде, модифицированном пленкой гексахлороплатината кобальта

Цистеин, цистин, глутатион восстановленный и глутатион окисленный, как и многие органические соединения, окисляется на СУ необратимо и с перенапряжением. При этом на вольтамперограмме окисления цистеина на СУ в 0.1 М растворе NaOH наблюдается плохо выраженная волна при $E_p + 0.60$ В (рис. 2, а). Окисление цистина на немодифицированном СУ на фоне 0.1 М раствора NaOH протекает с еще большим перенапряжением (за область потенциалов окисления фонового электролита), при этом на ЦВА отсутствуют пики электроокисления этого соединения (рис. 2, в). На вольтамперограммах окисления глутатиона восстановленного и глутатиона окисленного также отсутствуют максимумы токов в рабочей области потенциалов.

На ХМЭ с пленкой CoPtCl_6 на фоне 0.1 М NaOH происходит электрокаталитическое окисление всех рассматриваемых соединений (табл. 1). В качестве примера приведены ЦВА, полученные при окислении цистеина на этом ХМЭ на фоне 0.1 М NaOH (рис. 2, б, крив. 2). На анодной ветви этой ЦВА наблюдается пик при $E_p + 0.30$ В, высота которого зависит от концентрации субстрата. В этой же области потенциалов на фоновой кривой ХМЭ наблюдает-

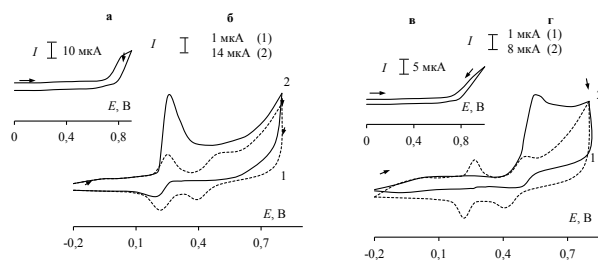
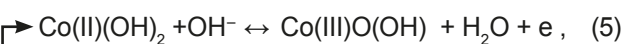


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы электроокисления $5 \cdot 10^{-3}$ М цистеина (а, б) и цистина (в, г) на СУ (а, в) и ХМЭ с пленкой CoPtCl_6 (б, г – кривые 2) на фоне 0.1 М раствора NaOH; пунктирная линия – фоновая кривая, полученная на ХМЭ в отсутствие субстрата (б, г – кривая 1)

ся максимум тока, характерный для редокс-пары Co(III)/Co(II) (рис. 2, б, крив. 1). Ток, регистрируемый на этом ХМЭ в присутствии цистеина, значительно превышает значение тока, полученное в его отсутствие. Многократный прирост тока при $E_p + 0.30$ В и линейная зависимость величины тока пика от концентрации субстрата позволяют отнести электрохимический процесс к каталитическому. Уменьшение потенциала окисления цистеина на этом ХМЭ ($E_{\text{кат}}$) по сравнению с потенциалом его окисления на СУ (E_s) ($\Delta E = E_{\text{кат}} - E_s$) составляет 300 мВ (рис. 2, а и б, табл. 1).

Поскольку электроокисление цистеина протекает при потенциалах, соответствующих окислению гидроксо-форм Co(II) , то можно предположить, что катализатором этой реакции являются оксо-гидроксо-формы кобальта (III), которая протекает по следующей схеме:



где RSH – цистеин, RSSR – цистин.

Окисление глутатиона на ХМЭ с пленкой CoPtCl_6 на фоне 0.1 М NaOH также, как и окисление цистеина, происходит по медиаторному механизму при $E_p + 0.30$ В (табл. 1). Однако величина каталитического тока и каталитического эффекта меньше величин $I_{\text{кат}}$ и $I_{\text{кат}}/I_{\text{мод}}$, полученных для цистеина,

Таблица 1

Вольтамперные характеристики, полученные при окислении серосодержащих соединений ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ М) на СУ и ХМЭ с пленкой CoPtCl_6 на фоне 0.1 М раствора NaOH

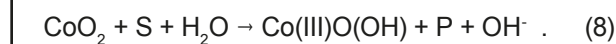
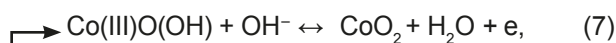
Субстрат	E_s , В	$E_{\text{мод}}$, В	$I_{\text{мод}}$, мкА	$E_{\text{кат}}$, В	$I_{\text{кат}}$, мкА	$I_{\text{кат}}/I_{\text{мод}}$
Цистеин	0.60	0.25	1.3	0.30	75.0	57.7
Глутатион	-			0.30	42.8	32.9
Цистин	-	0.55	1.6	0.55	45.0	28.1
Глутатион окисленный	-			0.55	32.0	20.0

Примечания: E_s и I_s – потенциал и ток пика окисления субстратов на СУ; $E_{\text{мод}}$ и $I_{\text{мод}}$ – потенциал и ток пика окисления модификатора; $E_{\text{кат}}$ и $I_{\text{кат}}$ – потенциал и ток пика каталитического окисления субстратов на ХМЭ.

что, вероятно, связано с более сложным строением молекулы глутатиона.

На анодной ветви ЦВА, полученных при окислении цистина и глутатиона окисленного на ХМЭ с пленкой CoPtCl_6 , наблюдается значительное увеличение тока окисления модификатора при $E_n + 0.55$ В (рис. 2, з, крив. 2). В этой области потенциалов на фоновой кривой ХМЭ наблюдается максимум тока, характерный для редокс-пары Co(IV)/Co(III) (рис. 2, з, крив. 1). Многократный прирост тока при $E_n + 0.55$ В (рис. 2, з, табл.1), линейная зависимость величины тока пика от концентрации субстратов позволяют отнести электрохимический процесс к каталитическому.

Поскольку электроокисление цистина и глутатиона окисленного протекает при потенциалах, соответствующих окислению оксо-гидроксо-форм Co(III) , то можно предположить, что катализатором этих электрохимических реакций являются оксо-формы Co(IV) и протекает по следующей схеме:



где S – цистин и глутатион окисленный, P – продукт окисления этих соединений.

Величина электрокаталитического эффекта при окислении цистина, цистина, глутатиона восстановленного и глутатиона окисленного на этом ХМЭ зависит от способа формирования неорганической пленки на поверхности СУ, например, от области циклирования потенциала и количества циклов. В качестве примера приведены зависимости от этих условий иммобилизации пленки CoPtCl_6 при окислении цистина и цистина (рис. 3). Максимальный прирост тока окисления модификатора в присутствии серосодержащих соединений фиксируется при получении пленки путем сканирования потенциала в области от -0.70 В до +1.30 В в течение 15 циклов.

Для установления природы тока при электроокислении цистина на ХМЭ изучена зависимость тока пика (I_p) окисления изучаемого субстрата от скорости наложения (v) потенциала. Ток в пике окисления цистина линейно увеличивается с ростом значения v (рис. 4, а), что свидетельствует об адсорбционной природе тока. Положительный на-

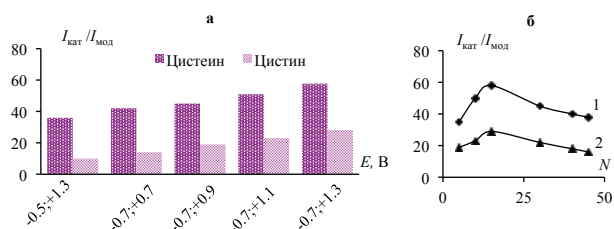


Рис. 3. Зависимость величины каталитического эффекта при окислении цистина (1) и цистина (2) на ХМЭ с пленкой CoPtCl_6 от области циклирования потенциала (а) и числа циклов (б) при осаждении пленки CoPtCl_6 на СУ

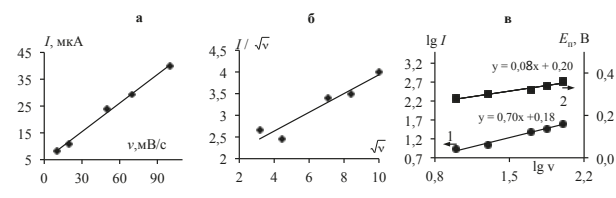


Рис. 4. Зависимость тока пика от скорости наложения потенциала в логарифмических единицах (а); зависимость отношения тока пика и корня квадратного из скорости наложения потенциала от корня квадратного из скорости наложения потенциала (б); зависимость логарифма тока и потенциала пика от логарифма скорости наложения потенциала (в) при электроокислении цистина на ХМЭ с пленкой CoPtCl_6

клон графика зависимости I/\sqrt{v} от \sqrt{v} (рис. 4, б) и найденное значение Семерано (рис. 4, в, зависимость 1) ($\Delta \lg I / \Delta \lg v$), равное 0.70, также свидетельствуют об адсорбционном лимитировании электрохимической реакции [26].

Вид зависимостей изменения значения каталитического тока от скорости наложения потенциала при окислении цистина, глутатиона восстановленного и глутатиона окисленного аналогичен выше приведенным зависимостям для цистина.

Из уравнения зависимостей E_n от $\lg v$ (рис. 4, в, зависимость 2) были рассчитаны величины наклона Тафеля (b), коэффициента переноса электрона (α) и константы скорости электрокаталитической реакции (k_s) [27, 28]. Для необратимых диффузионных процессов наклон Тафеля и коэффициент переноса электрона находят по формулам: $E_n = \text{constant} + b/2 \lg v$ и $b = 2.3 RT / (1 - \alpha) nF$ [27]. Рассчитанное значение α использовали для расчета константы скорости электронного переноса по формуле [28]: $\lg k_s = \alpha \lg (1 - \alpha) + (1 - \alpha) \lg \alpha - \lg RT / nFv - \alpha (1 - \alpha) nF \Delta E_n / 2.3 RT$, где ΔE_n – разность потенциалов катодного и анодного пиков, v – скорость наложения потенциала (20 мВ/с). Рассчитанные кинетические параметры электродного процесса окисления рассматриваемых соединений на электроде CoPtCl_6 -СУ представлены в табл. 2. Полученные значения константы скорости электрокаталитической реакции хорошо коррелируют со значениями электрокаталитических эффектов, наблюдаемых при окислении рассматриваемых субстратов (табл. 1).

В результате электрохимического осаждения пленки CoPtCl_6 и последующей обработки электрода CoPtCl_6 -СУ в растворе 0.1 М NaOH на его поверхности образуются несколько каталитических центров, проявляющих свою электрокаталитическую активность по отношению сульфгидрильной и дисульфидной группам при разных потенциалах. Разность четко выраженных потенциалов пиков каталитического окисления соединений с сульфгидрильной и дисульфидной группами составляет 250 мВ (рис. 5).

На основании полученных результатов разработан способ совместного вольтамперометрического определения тиолов (цистеина и глутати-

Таблица 2

Кинетические параметры, полученные при окислении серосодержащих соединений ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ М) на ХМЭ с пленкой CoPtCl_6 на фоне 0.1 М раствора NaOH

Субстрат	$\Delta \lg I / \Delta \lg v$	b , мВ	α	k_s , с^{-1}
Цистеин	0.69	160	0.64	$0.94 \cdot 10^2$
Глутатион	0.77	156	0.63	$0.56 \cdot 10^2$
Цистин	0.71	131	0.56	$0.50 \cdot 10^2$
Глутатион окисленный	0.78	144	0.60	$0.43 \cdot 10^2$

Таблица 3

Аналитические характеристики вольтамперометрического определения серосодержащих соединений на ХМЭ с пленкой CoPtCl_6 на фоне 0.1 М раствора NaOH

Субстрат	Диапазон концентраций, моль/л	Уравнение регрессии $I = a + b C$		R
		$a \pm \Delta a$	$b \pm \Delta b$	
Цистеин	$5 \cdot 10^{-6} \div 5 \cdot 10^{-2}$	3.2 ± 0.1	$(1.43 \pm 0.02) \cdot 10^4$	0.999
Цистин	$5 \cdot 10^{-6} \div 5 \cdot 10^{-2}$	2.2 ± 0.1	$(0.86 \pm 0.04) \cdot 10^4$	0.999
Глутатион	$5 \cdot 10^{-6} \div 5 \cdot 10^{-2}$	2.6 ± 0.3	$(0.81 \pm 0.01) \cdot 10^4$	0.998
Глутатион окисленный	$5 \cdot 10^{-6} \div 5 \cdot 10^{-2}$	2.2 ± 0.2	$(0.60 \pm 0.05) \cdot 10^4$	0.991

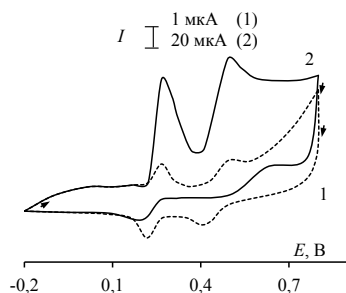


Рис.5. Циклические вольтамперограммы, полученные на ХМЭ с пленкой CoPtCl_6 в отсутствие (1) и в присутствии (2) $5 \cdot 10^{-3}$ М цистеина и цистина на фоне 0.1 М раствора NaOH

она восстановленного) и дисульфидов (цистина и глутатиона окисленного) по двум пикам на одной вольтамперограмме. Величина каталитического тока пропорциональна концентрации всех субстратов в интервале от $50 \cdot 10^{-3}$ до $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Уравнение регрессии для цистеина, цистина, глутатиона восстановленного и глутатиона окисленного приведены в табл. 3.

Правильность этого способа оценена методом “введено-найденно” (табл. 4). Величина S_r не превышает 5 % во всем диапазоне концентраций.

Каталитический отклик ХМЭ стабилен в течение недели. Для улучшения метрологических характеристик можно ежедневно проводить электрохимическую регенерацию поверхности ХМЭ в потенциодинамическом режиме в растворе фоновых электролита (0.1М раствора NaOH).

Разработанный способ вольтамперометрического определения органических соединений на ХМЭ был использован для определения компонентов тиол-дисульфидного коэффициента. В качестве объекта для определения численного значения ТДК был использован клинический образец плазмы крови человека, подверженный предварительному гемолизу, который состоял в следующем: кровь, взятую из локтевой вены, вносили в пробирку, содержащий антикоагулянт (трилон-Б). Клинические образцы плазмы крови принадлежали женщинам в возрасте от 25 до 30 лет. Затем эту кровь с антикоагулянтом подвергали осмотическому гемолизу и центрифугированием удаляли клеточные мембраны. В гемолизате измеряли общее или суммарное содержание сульфгидрильных и дисульфгидрильных групп разработанным вольтамперометрическим способом на ХМЭ с пленкой из CoPtCl_6 . Для вольтамперометрического определения тиолов и дисульфидов в гемолизате крови проводили следующую пробоподготовку:

Таблица 4

Метрологические характеристики определения серосодержащих соединений на ХМЭ с пленкой CoPtCl_6 на фоне 0.1 М раствора NaOH, $n = 6$, $P = 0.95$

Аналит	Введено, мкМ	Найдено, $(x \pm \Delta x)$, мкМ	S_r
Цистеин	5.0	4.8 ± 0.2	0.04
	10.0	9.7 ± 0.3	0.03
	100	101 ± 1	0.01
Цистин	5.0	4.8 ± 0.3	0.05
	10.0	10.0 ± 0.5	0.05
	100	100 ± 4	0.04
Глутатион	5.0	4.9 ± 0.2	0.04
	10.0	10.2 ± 0.3	0.03
	100	98 ± 2	0.02
Глутатион окисленный	5.0	4.8 ± 0.3	0.05
	10.0	9.9 ± 0.4	0.04
	100	101 ± 2	0.02

Таблица 5

Результаты вольтамперометрического определения компонентов и значения тиол-дисульфидного коэффициента на ХМЭ с пленкой CoPtCl_6 в плазме крови человека ($n = 6$, $P = 0.95$, $t_{\text{табл}} = 2.57$)

Объект исследования	Показатели тиол-дисульфидной системы			Среднее стандартное значение -SH/-SS-	
	$C_{\text{-SH}}$, мМ	$C_{\text{-SS}}$, мМ	-SH/-SS-	для женщин	для мужчин
Проба крови	8.55 ± 0.05	3.30 ± 0.03	2.58 ± 0.07	2.58 – 2.65	2.50 – 2.56
	9.14 ± 0.05	3.50 ± 0.03	2.61 ± 0.07		

в мерную колбу на 10 мл вводили 1 мл полученного гемолизата крови и доводили до метки фоновым электролитом (0.1М раствором NaOH). В табл. 5 представлены результаты определения тиол-дисульфидного коэффициента (-SH/-SS-) в крови. Значения концентраций тиольных ($C_{\text{-SH}}$) и дисульфидных ($C_{\text{-SS}}$) соединений в крови для здоровых людей находятся в диапазоне от 11.0 до 8.0 мМ и от 4.5 до 3.0 мМ для тиолов и дисульфидов соответственно [5]. Полученные значения ТДК, равные 2.58 и 2.61, соответствуют стандартному показателю для здорового человека.

Таким образом, предложен способ чувствительного и селективного вольтамперометрического определения серосодержащих соединений в крови, с помощью которого можно рассчитывать отношение содержания тиолов и дисульфидов, то есть значение ТДК.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 12-03-97031 и № 13-03-01101).

Acknowledgements

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant № 12-03-97031 and № 13-03-01101).

ЛИТЕРАТУРА

1. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease / R.A. Roberts [et al.] // Toxicol Sci. 2009. V. 112, N.1. P. 4-16.
2. Костюшев В.В., Бокал И.И. Роль тиолдисульфидной системы в механизме оксидативного стресса и дистресса при вич инфекции // Биомедицинская химия. 2010. Т. 56, Вып. 2. С. 290-298.
3. Hawkley L.C., Cacioppo J.T. Stress and the aging immune system Brain // Brain Behav Immun. 2004. V. 18, N. 2. P. 114-119.
4. Papaharalambus C.A., Griendling K.K. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury // Trends Cardiovasc Med. 2007. V. 17, N. 2. P. 48-54.
5. Терза В.Ю., Резункова О.П., Корытова Л.И. Эффективность величины тиол-дисульфидного коэффициента для анализа антиоксидантной системы онкологических больных // Вестник российской военно-медицинской академии. 2012. Т. 39, Вып. 3. С. 183-187.
6. Участие тиолдисульфидной системы в регуляции окислительной модификации белков в нейтрофилах при

окислительном стрессе / Е.А. Степовая [и др.] // Бюллетень СО РАМН. 2010. Т. 30, Вып. 5. С. 64-69.

7. Соколовский В.В. Тиол-дисульфидное соотношение крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма. СПб, 1996. 30 с.

8. Перспективы использования анализатора тиоловых антиоксидантов в клинической практике для оценки неспецифической резистентности организма при различных критических состояниях и для прогнозирования акушерских осложнений / Ю.С. Полушин [и др.] // Научное приборостроение. 2013. Т. 23, Вып. 3. С. 5-12.

9. Яшин А., Яшин Я. Высокоэффективная жидкостная хроматография маркеров окислительного стресса // Аналитика. 2011. Т. 1. С. 34-43.

10. A simultaneous liquid chromatography/mass spectrometric assay of glutathione, cysteine, homocysteine and their disulfides in biological samples / X. Guan [et al.] // J. Pharmaceut Biomed Anal. 2003. V. 31, N. 2. P. 251-261.

11. Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize (Zea mays L.) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection / D. Potesil [et al.] // J. Chromatogr. A. 2005. V. 1084, N. 1-2. P. 134-144.

12. Determination of glutathione in single human hepatocarcinoma cells by capillary electrophoresis with electrochemical detection / W. Wang [et al.] // J Chromatogr B. 2003. V. 789, N. 2. P. 425-429.

13. Simultaneous determination of cysteine, ascorbic acid and uric acid by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence / Y. Tao [et al.] // J. Electroanal. Chem. 2012. V. 674. P. 65-70.

14. Hormozi-Nezhad M.R., Seyedhosseini E., Robatjazi H. Spectrophotometric determination of glutathione and cysteine based on aggregation of colloidal gold nanoparticles // Sci Iran. 2012. V. 19, N. 3. P. 958-963.

15. Liao C.-Y., Zen J.-M. Development of a method for total plasma thiols measurement using a disposable screen-printed carbon electrode coupled with a MnO_2 reactor // Sensors and Actuators B. 2008. V. 129, N. 2. P. 896-902.

16. Lock J., Davis J. The determination of disulphide species within physiological fluids // Trends in Analytical Chemistry. 2002. V. 21, N. 12. P. 807-815.

17. Шайдарова Л.Г., Будников Г.К. Химически модифицированные электроды на основе благородных металлов, полимерных пленок или их композитов в органической вольтамперометрии (Обзор) // Журн. аналит. химии. 2008. Т. 63, № 10. С. 1014-1037.

18. Шайдарова Л. Г., Будников Г. К. Амперометрические сенсоры с каталитическими свойствами в органической вольтамперометрии // Проблемы аналитической химии. Т.14: Химические сенсоры. / Под ред. Власова Ю.Г. М.: Наука, 2011. С. 203-284

19. Структурное исследование пленок гексацианоферрата кобальта, синтезированных из комплексного электролита / Каплун М.М. [и др.] // Электрохимия. 2001. Т. 37, № 9. С. 1065-1075.

20. Pei J., Li X.-Y., Buffle J. Preparation, characterization and application of an electrode modified with electropolymerized CuPtBr₆ film // *Electrochim. Acta*. 2000. V. 45, N. 10. P. 1581-1593.

21. Chen S.-M., Lin K.-H. The electrochemical properties of NADH and NAD⁺ and their electrocatalytic reactions with tin hexachloroplatinate films // *J. Electroanal. Chem.* 2004. V. 571, N. 2. P. 223-232.

22. Pei J., Li X.-Y. Electrochemical study and flow-injection amperometric detection of trace NO₂⁻ at CuPrCl₆ chemically modified electrode // *Talanta*. 2000. V. 51, N. 6. P. 1107-1115.

23. Chen S.-M., Li S.-H., Thangamuthu R. Electrochemical Preparation, Characterization, and Electrocatalytic Properties of OsPtCl₆ Film Electrodes Towards Reduction of NAD⁺, Chloroacetic Acids, and Nitrous Oxide // *Electroanalysis*. 2009. V. 21, N. 13. P. 1505-1513.

24. Barbero C., Planes G.A., Miras M.C. Redox coupled ion exchange in cobalt oxide film // *Electrochem. Commun.* 2001. V. 3, N. 3. P. 113-116.

25. Electro-oxidation of ascorbic acid catalyzed on cobalt hydroxide-modified glassy carbon electrode / G. Karim-Nezhad [et al.] // *J. Serb. Chem. Soc.* 2009. V. 74, N. 5, P. 581-593.

26. Будников Г.К., Майстренко В.Н., Вяселев М.Р. Основы современного электрохимического анализа. М: Изд-во Мир: Бином ЛЗ, 2003. 592 с.

27. Bard A. J., Faulkner L.R. *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*. New York.: WILEY, 2000. 833 p.

28. Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems // *J. Electroanal. Chem.* 1979. V. 101. N. 1. P. 19-28.

REFERENCES

1. Roberts R.A., Laskin D.L., Smith C.V., Robertson F.M., Allen E.M., Doorn J.A., Slikker W. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol Sci*, 2009, vol. 112, no.1, pp. 4-16. doi: 10.1093/toxsci/kfp179.

2. Kostiushev V.V., Bokal I.I. [The role of the thiol-disulfide system in the mechanism of oxidative stress and distress in HIV infection]. *Biomeditsinskaya Khimiya* [Biomedical Chemistry], 2010, vol.56, no.2, pp. 290-298 (In Russian).

3. Hawkey L.C., Cacioppo J.T. Stress and the aging immune system *Brain. Brain Behav Immun*, 2004, vol. 18, no. 2, pp. 114-119.

4. Papaharalambus C.A., Griendling K.K. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, vol. 17, no. 2, pp. 48-54. doi: 10.1016/j.tcm.2006.11.005.

5. Tegza V.Y., Resunkova O.P., Korytova L.I. [Efficiency values of thiol-disulfide ratio analysis for the antioxidant system of cancer patients]. *Vestnik rossiiskoi voenno-meditsinskoi akademii* [Bulletin of the Russian Military Medical Academy], 2012, vol. 39, no.3. pp. 183-187 (In Russian).

6. Stepovaia E.A., Zhavoronok T.V., Petina G.V., Riazantseva N.V., Ivanov V.V., Tetenev F.F., Ageeva T.G., Novitskii V.V. [Participation of thiol-disulfide system in the regulation of proteins oxidative modification in neutrophils during oxidative stress]. *Bulleten' SO RAMN* [Bulletin SO RAMN], 2010, vol. 30, no.5, pp. 64-69 (In Russian).

7. Sokolovskii V.V. Tiol-disulfidnoe sootnoshenie krovi kak pokazatel' sostoiianiia nespetsificheskoi rezistentnosti organizma [Thiol-disulfide ratio of blood as an indicator of the state of nonspecific resistance]. St. Petersburg, 1996. 30 p. (In Russian).

8. Polushin Y.S., Levshankov A.I., Lakhin R.E., Pashchinin A.N., Bezrukova E.V., Piskunovich A.L., Kostyuchek D.F., Be-lozerova A.K., Gaidukov S.N., Shapkaits V.A., Be-lozerova L.A., Krasnov N.V. [Perspective for the use thiol antioxidants analyzer in clinical practice for assess nonspecific resistance at various critical conditions and for predict obstetric complications]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrument], 2013, vol. 23, no.3, pp. 5-12 (In Russian).

9. Iashin A., Iashin H. [High performance liquid chromatography of the oxidative stress markers] // *Analitika* [Analyt-ics], 2011, vol. 1, pp. 34-43 (In Russian).

10. Guan X., Hoffman B., Dwivedi C., Matthees D.P. A simultaneous liquid chromatography/mass spectrometric assay of glutathione, cysteine, homocysteine and their disulfides in biological samples. *J. Pharmaceut Biomed Anal*, 2003, vol. 31, no. 2, pp. 251-261. doi:10.1016/S0731-7085(02)00594-0.

11. Potesil D., Petrova J., Adam V., Vacek J., Klejdus B., Zehnalek J., Trnkova L., Havel L., Kizek R. Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize (*Zea mays* L.) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, 2005, vol. 1084, no. 1-2, pp. 134-144. doi:10.1016/j.chroma.2005.06.019.

12. Wang W., Xin H., Shao H., Jin W. Determination of glutathione in single human hepatocarcinoma cells by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Chromatogr B*, 2003, vol. 789, no. 2, pp. 425-429. doi:10.1016/S1570-0232(03)00105-3.

13. Tao Y., Zhang X., Wang J., Wang X., Yang N. Simultaneous determination of cysteine, ascorbic acid and uric acid by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence. *J. Electroanal. Chem*, 2012, vol. 674, pp. 65-70. doi:10.1016/j.jelechem.2012.03.009.

14. Hormozi-Nezhad M.R., Seyedhosseini E., Robatjazi H. Spectrophotometric determination of glutathione and cysteine based on aggregation of colloidal gold nanoparticles. *Sci Iran*, 2012, vol. 19, no. 3, pp. 958-963. doi:10.1016/j.scient.2012.04.018.

15. Liao C.-Y., Zen J.-M. Development of a method for total plasma thiols measurement using a disposable screen-printed carbon electrode coupled with a MnO₂ reactor. *Sensors and Actuators B*, 2008, vol. 129, no. 2, pp. 896-902. doi:10.1016/j.snb.2007.10.004.

16. Lock J., Davis J. The determination of disulphide species within physiological fluids. *Trends in Analytical Chemistry*, 2002, vol. 21, no. 12, pp. 807-815. doi:10.1016/S0165-9936(02)01203-7.

17. Shaidarova L.G., Budnikov G.K. [Chemically modified electrodes based on noble metals, polymer films or composites in organic voltammetry (Review)]. *Zhurnal Analiticheskoi khimii* [Journal of Analytical Chemistry], 2008, vol. 63, no.10, pp. 1014-1037 (In Russian). doi: 10.1134/S106193480810002X.

18. Shaidarova L.G., Budnikov G.K. *Amperometricheskie sensori s kataliticheskimi svoistvami v organicheskoi voltamperometrii*. V. 14: *Chemicheskie sensori* [Amperometric sensors with catalytic properties in organic voltammetry / Problems of analytical chemistry. V. 14: Chemical sensors]. Moscow, Nauka, 2011. 203-284 p. (In Russian).

19. Kaplun M.M., Smirnov U.E., Mikli V., Malev V.V. *Strukturnoe issledovanie plenok geksatsianoferata kobal'ta, sintetirovannyh iz kompleksnogo elektrolita* [Structural investigation of cobalt hexacyanoferrate films synthesized from complex electrolyte]. *Elektrokhimiya* [Electrochemistry], 2001, vol. 37, no. 9, pp. 1065-1075 (In Russian).

20. Pei J., Li X.-Y., Buffle J. Preparation, characterization and application of an electrode modified with electropolymer-

- ized CuPtBr₆ film. *Electrochim. Acta*, 2000, vol. 45, no. 10, pp. 1581-1593. doi:10.1016/S0013-4686(99)00323-0.
21. Chen S.-M., Lin K.-H. The electrochemical properties of NADH and NAD⁺ and their electrocatalytic reactions with tin hexachloroplatinate films. *J. Electroanal. Chem*, 2004, vol. 571, no. 2, pp. 223-232. doi:10.1016/j.jelechem.2004.05.013.
22. Pei J., Li X.-Y. Electrochemical study and flow-injection amperometric detection of trace NO₂⁻ at CuPrCl₆ chemically modified electrode. *Talanta*, 2000, vol. 51, no. 6, pp. 1107-1115. doi:10.1016/S0039-9140(00)00279-4.
23. Chen S.-M., Li S.-H., Thangamuthu R. Electrochemical Preparation, Characterization, and Electrocatalytic Properties of OsPtCl₆ Film Electrodes Towards Reduction of NAD⁺, Chloroacetic Acids, and Nitrous Oxide. *Electroanalysis*, 2009, vol. 21, no. 13, pp. 1505-1513. doi: 10.1002/elan.200804569.
24. Barbero C., Planes G.A., Miras M.C. Redox coupled ion exchange in cobalt oxide film. *Electrochem. Commun*, 2001, vol. 3, no. 3, pp. 113-116. doi:10.1016/S1388-2481(01)00107-2.
25. Karim-Nezhad G., Hasanzadeh M., Saghatforoush L., Shadjou N., Khalilzadeh B., Ershad S. Electro-oxidation of ascorbic acid catalyzed on cobalt hydroxide-modified glassy carbon electrode. *J. Serb. Chem. Soc*, 2009, vol. 74, no. 5, pp. 581-593. doi: 10.2298/JSC0905581K.
26. Budnikov G.K., Maistrenko V.N., Viaselev M.R. *Osnovy sovremennogo elektrokhimicheskogo analiza [Fundamentals of modern electrochemical analysis]*. Moscow, Mir: Bionom LZ, 2003. 592 p. (In Russian).
27. Bard A. J., Faulkner L.R. *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*. New York, WILEY, 2000. 833 p.
28. Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *J. Electroanal. Chem*, 1979, vol. 101, no. 1, pp. 19-28. doi:10.1016/S0022-0728(79)80075-3.